



PCT

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 38/39, A23L 1/305		A1	(11) 国際公開番号 W096/41644																																								
			(43) 国際公開日 1996年12月27日(27.12.96)																																								
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01623 (22) 国際出願日 1996年6月13日(13.06.96)  (30) 優先権データ 特願平7/171486 1995年6月13日(13.06.95) JP  (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 日本ハム株式会社(NIPPON MEAT PACKERS, INC.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 Osaka, (JP) (71) 出願人(米国についてのみ) 中上昌代(NAKAGAMI, Masayo)[JP/JP] (中上辰芳(死亡)の相続人) 〒662 兵庫県西宮市仁川町6丁目2-3 Hyogo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 松本貴之(MATSUMOTO, Takashi)[JP/JP] 田口靖希(TAGUCHI, Yasuki)[JP/JP] 藤田浩太郎(FUJITA, Kotaro)[JP/JP] 〒300-26 茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番 日本ハム株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP)		鮎谷章夫(AMETANI, Akio)[JP/JP] 〒113 東京都文京区西片1-1-5 パークハイム文京西片501 Tokyo, (JP) 上野川修一(KAMINOGAWA, Syuichi)[JP/JP] 〒344 埼玉県春日部市増田新田400-8 Saitama, (JP) (72) 発明者 中上辰芳(NAKAGAMI, Tatsuyoshi) (死亡、相続人は中上昌代) (74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)  (81) 指定国 CA, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).																																									
		添付公開書類 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。																																									
(54) Title : ORAL REMEDY FOR RHEUMATOID ARTHRITIS AND FUNCTIONAL FOOD																																											
(54) 発明の名称 経口慢性関節リウマチ治療剤及び機能性食品																																											
(57) Abstract																																											
<p>An oral remedy for rheumatoid arthritis and a functional food each comprising type II collagen which has been denatured (fragmented) under specific conditions. It is believed that rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease wherein type II collagen serves as the antigen. Because of having a high oral tolerogenicity, the denatured type II collagen suppresses the immune response to type II collagen and enables the prevention and treatment of RA. In particular, it exerts the effect of permitting the prevention and treatment of RA via convenient oral administration thereof.</p>																																											
<table border="1"> <caption>Data extracted from the graph</caption> <thead> <tr> <th>Time (days)</th> <th>Casein (c) (%)</th> <th>Undenatured type II collagen (d) (%)</th> <th>Denatured collagen A (e) (%)</th> <th>Denatured collagen B (f) (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>10</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>20</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>30</td><td>30</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>35</td><td>80</td><td>10</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>40</td><td>85</td><td>30</td><td>10</td><td>0</td></tr> <tr><td>45</td><td>90</td><td>55</td><td>20</td><td>0</td></tr> </tbody> </table> <p>           a ... Incidence of CIA (%)            b ... Time (days) after immunization            c ... casein            d ... undenatured type II collagen            e ... denatured collagen A            f ... denatured collagen B         </p>				Time (days)	Casein (c) (%)	Undenatured type II collagen (d) (%)	Denatured collagen A (e) (%)	Denatured collagen B (f) (%)	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0	30	30	0	0	0	35	80	10	0	0	40	85	30	10	0	45	90	55	20	0
Time (days)	Casein (c) (%)	Undenatured type II collagen (d) (%)	Denatured collagen A (e) (%)	Denatured collagen B (f) (%)																																							
0	0	0	0	0																																							
10	0	0	0	0																																							
20	0	0	0	0																																							
30	30	0	0	0																																							
35	80	10	0	0																																							
40	85	30	10	0																																							
45	90	55	20	0																																							

(57) 要約

本発明の経口慢性関節リウマチ治療剤及び機能性食品は、特定の条件下に変性（断片化）されたII型コラーゲンを含有することからなる。慢性関節リウマチ(RA)はII型コラーゲンを抗原とする自己免疫疾患であると考えられており、本発明で使用される変性II型コラーゲンは高い経口免疫寛容原性を有するので、II型コラーゲンに対する免疫応答が抑制され、RAの予防・治療を行うことができ、特に投与が簡便な経口投与によりRAの予防・治療を図ることができるという効果を奏する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソトニア	SDE	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルク	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SIK	スロヴェニア
BF	ブルガリア・ファン	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SZ	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SD	スウェーデン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	VI	ヴィエトナム	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジニノヴゴロド	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ヴィエトナム

## 明 紹 書

## 経口慢性関節リウマチ治療剤及び機能性食品

## 5 技術分野

本発明は経口慢性関節リウマチ治療剤及び機能性食品に関する。より詳細には、変性させたII型コラーゲンを含有し、慢性関節リウマチの治療・予防に有用な薬剤及び機能性食品に関する。

## 10 背景技術

慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis, 以下、RAという) は罹患者の多い慢性疾患の一つであり、結合組織に炎症をきたす全身的な疾患である。当該疾患は、主に関節の滑膜に非特異的炎症を起し、全身の多発性関節炎の病像を呈し、軟骨や骨の損傷をきたす。

15 RAの発病メカニズムは充分に解析されていないが、リンパ球抗原 (HLA) - DR4 が関係し、活性化T細胞が関与する自己免疫疾患であると考えられている (Lancet 341, 283, 1993)。II型コラーゲンが軟骨中の主要構造蛋白であることや実験動物にII型コラーゲンを投与するとリウマチ関節炎と形態的に類似した症状を起すことから、II型コラーゲンが本疾患の自己抗原の一つであると考えられている (J. Exp. Med. 146, 857, 1977; Lab. Invest. 54, 26, 1986)。

20 RAに対する治療剤としては、抗リウマチ剤(金塩製剤、D-ペニシラミン等)、非ステロイド剤、免疫抑制剤などが汎用されているが、これらの薬剤の投与により十分な効果が得られないようなときには、強い抗炎症作用と免疫抑制作用を有しているステロイド剤が用いられる。

25 上記の薬剤によるRAの治療は対症療法的であり、根治的な治療法とはいえない。また、ステロイド剤は重篤な副作用を引き起こすおそれがあるので、その使用に際しては十分な注意をはらい、常に減量や使用中止を考慮する必要性のあることが指摘されている。最も望ましいRAの治療法は、疾患特異的なメカニズムに基づいて関節の炎症を軽減することであり、使

用される薬剤は毒性のないことが望ましい。

このような観点から、免疫寛容に基づくRAの治療法が注目されている。免疫寛容とは、ある条件下に抗原で動物を処理しておくと、次にこの抗原で適切な免疫操作を行っても、抗体産生などの免疫応答が起こらない現象であり、免疫寛容を導く物質は免疫寛容原と称される。免疫寛容によるRAの治療法としては、II型コラーゲン又はその部分配列を有するペプチドを免疫寛容原として用い、このペプチドを新生児ラットに静脈ないし腹腔内投与すると、RAの発症を抑制することができる事が報告されている(J. Exp. Med. 170, 1999, 1989; J. Immunology 151, 500, 1993)。

上記の方法においては、免疫寛容原は静脈ないし腹腔内投与されているが、静脈ないし腹腔内投与による免疫寛容原の投与は煩雑であるのみならず、免疫寛容原のペプチドをRA患者に連続的に静脈ないし腹腔内投与する場合には、RA患者に重篤なアレルギー反応やショックなどを引き起こすことも想定される。そこで、より簡便で且つ安全な投与方法によるRAの治療法が望まれている。

また、医薬品としてのみならず、日常的な食物の摂取を通してRAの治療・予防を図ることができればより好ましく、RAの治療・予防を目的とする機能性食品も求められている。

このような観点から、安全性が高く且つ簡便な投与方法によるRAの治療法が切望されており、経口免疫寛容によるRAの予防・治療が検討されている。経口免疫寛容、ひろくは粘膜免疫寛容は、抗原が経口的に腸管等の粘膜を通って入った場合、その抗原に対して全身の免疫応答が失われる現象であり、経口免疫寛容においては、抗原が経口的に腸管等の粘膜を通じて吸収されるとき、パイエル板、腸管上皮細胞及びこれと隣接するリンパ球、門脈、肝臓などのいろいろの器官と機能による作用を受けるので、アレルギー反応やショックなどを引き起こすことが少なく、アレルギーや臓器移植における免疫抑制療法として試みられている。

また、抗原が経鼻的に投与された場合にも、上記のような消化管粘膜を通じて吸収と共に、気道または肺などの粘膜を通じて吸収がなされるので、その抗原に対しての全身性免疫応答が失われる免疫寛容現象が生じる。

経口免疫寛容によるRAの予防について、ウシ関節由来未変性II型コラーゲンを経口投与（胃内投与）されたマウスにおいて、コラーゲン誘導性関節炎（CIA）の発症が抑制されたことが報告されている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7443, 1986）。しかし、この報文では、加熱変性されたII型コラーゲンでは、CIA発症の抑制効果は認められなかったことが記載されている。また、II型コラーゲンの経口免疫寛容原性に關し、加熱処理することにより、免疫原性（抗原性又はアレルギー発症能）を低下させることができるが、免疫寛容原性は未変性のものと同程度か又はそれより低下することができる（J. Clin. Invest., 69, 673-683, 1982; J. Immun., 140, 1477-1484, 1988）。

また、最近に発行された米国特許第5,399,437号には、II型ホール・コラーゲンを経口投与することからなるリウマチ性関節炎の治療方法が開示されている。

本発明者等はこの経口免疫寛容に注目し、銳意研究を重ね、II型コラーゲンの加熱変性条件を検討してきた。その結果、上記の報文の記載に反し、熱変性II型コラーゲンは経口免疫寛容原として有用であり、RAの発症を抑制できることを見出した。即ち、上記文献に記載の熱変性条件ではコラーゲンの熱変性が不十分であり、更に過酷な条件で熱変性して調製したII型コラーゲンは未変性II型コラーゲンより高い経口免疫寛容原性を有することが判明した。

また、アミノ酸配列を特異的に認識する薬剤でII型コラーゲンを処理し、得られたII型コラーゲンの変性物（断片化物）が未変性II型コラーゲンより高い経口免疫寛容原性を有することが判明した。

本発明はかかる知見に基づいてなされたもので、RAの予防・治療に有用な経口薬剤及び機能性食品を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

上記の課題を解決するためになされた本発明は、酸性もしくはアルカリ性条件下に熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンを有効成分として含有する経口慢性

関節リウマチ治療剤である。

また、本発明の他の発明は、酸性もしくはアルカリ性条件下に熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンを含有する機能性食品である。

5 本発明で用いられる変性II型コラーゲンは、高い経口免疫寛容性を有するので、本発明の治療剤を投与又は本発明の機能性食品を摂取することにより、免疫応答が抑制され、RAの治療及び予防を行うことができる。

なお、本発明においては、便宜上、「経口」には、通常の経口の他、経鼻、経腸及び経粘膜も含まれるものとする。

10

#### 図面の簡単な説明

図1は、実験例4におけるCIAの発症率を示す図である。

図2は、実験例5におけるCIAの発症指数を示す図である。

図3は、実験例5におけるCIAの発症足の割合を示す図である。

15 図4は、実験例6における、II型コラーゲンに対する抗体のサブクラス別の抗体産生量を示す図である。

図5は、実験例8におけるII型コラーゲン熱変性物の電気泳動写真である。

20

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の経口慢性関節リウマチ治療剤及び機能性食品は、熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンを含有することからなる。

25 一般に、コラーゲン分子は、-Gly-X-Y- (X及びYはアミノ酸残基) の繰り返しからなるアミノ酸約1000残基 (分子量約10万) のポリペプチド鎖 ( $\alpha$ 鎖) が3本摺り合わされてできている。現在までに発見されているコラーゲン分子の種類は19種 (I型～IX型) あり、その内、II型コラーゲンは3本の $\alpha$ 1 (II) 型ポリペプチド鎖で構成され、関節軟骨、椎間板髓核、眼ガラス体などに多く含まれている。

30

本発明において、原料となるII型コラーゲンの精製・単離は慣用の方法

に準じて行うことができ、例えば、II型コラーゲンを含有する生体組織を、ペプシン、プロナーゼなどの蛋白分解酵素を用いて限定分解し、塩分別沈殿法などで精製することにより調製することができる(J. Exp. Med. 146, 857-868, 1977; Arthrits Rheum. 22, 1344, 1979; J. Immunol. 124, 2912, 1980など参照)。また、既に市販されているII型コラーゲンを用いることもできる。II型コラーゲンの由来は特に限定されず、例えば、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ヒト、サル、ウサギ、マウス、ラット等の哺乳類、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ等の鳥類、カメ、ヘビ等の爬虫類、マグロ、カツオ、サケ、サメ、エイ等の魚類など由来のコラーゲンが例示される。

更には、上記の各種動物のII型コラーゲンのアミノ酸配列に関する知見に基づいて化学合成されたII型コラーゲン、又は遺伝子組換技術により作製されたII型コラーゲンを用いることもできる。

本発明における熱変性II型コラーゲンは、酸性条件下又はアルカリ性条件下にII型コラーゲンを熱変性することにより調製される。後記実験例に示されるように、かかる熱変性によりII型コラーゲンは断片化される。

熱変性条件は、加熱温度及び加熱時間により適宜調整し得るが、通常、60°C以上で且つ10分間以上の条件が適用され、好ましくは65°C以上で15分間以上、より好ましくはオートクレーブ処理(例えば、121°C、15分間程度)が利用される。

酸性条件としては、例えば、クエン酸、酢酸、塩酸などの有機又は無機酸類を用いた溶液が例示され、好ましいpH範囲としては5.5以下、より好ましくは2.0~4.5が例示される。アルカリ性条件としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエタノールアミンなどの無機又は有機塩基を用いた溶液が例示され、好ましいpH範囲としては9.5以上、より好ましくは10.0~12.0が例示される。

好ましい熱変性条件としては、II型コラーゲンの無機酸又は有機酸水溶液を、65°C以上、好ましくは100°C程度で、15分間以上、好ましくは20分間程度加熱するか；オートクレーブを用いて、110°C程度で30分間以上、好ましくは2~10時間程度加熱するか、120°C程度で1

5分間以上、好ましくは20分間加熱する方法が挙げられる。

なお、後記実験例に示されるように、かかる熱変性II型コラーゲンは、II型コラーゲン $\alpha$ 1鎖より低分子量の限定分解物を含有している。

本発明における他の変性II型コラーゲンは、アミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性（断片化）させたII型コラーゲンである。

アミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性（断片化）する手段としては、種々の物質及びその切断部位が知られており、それら変性薬剤の市販品を利用することができる。その一例を示せば、次のとおりである（なお、切断部位は↓で示す）。化学薬剤としては、ヒドロキシルアミン：Asn↓Gly、蟻酸：Asp↓Pro、酢酸：Asp↓Pro、BNP S-スカトール：Trp↓、o-ヨードソベンゾ酢酸：Trp↓などが例示できる。酵素としては、キモトリプシン：Trp↓及びTyr↓及びPhe↓、コラゲナーゼ：Pro-X↓Gly-Pro、エンドプロテナーゼLys-C：Lys↓、トロンビン：Arg-Gly-Pro-Arg↓、トリプシン：Arg↓及びLys↓などが例示できる。

なお、これらの薬剤は単独または2種以上を組み合わせて使用することもできる。また、上記の薬剤の使用は常法に準じて行うことができる、また使用量、反応温度等の条件も常法に準じて適宜設定することができるが、II型コラーゲンを30℃以上で且つ10分間以上加温して、 $\alpha$ 1 (II) 型ポリペプチド鎖の3本が摺り合わさってなるII型コラーゲンの螺旋状の立体構造を解き、その後に上記の薬剤を作用させるのが好ましい。

更に、変性（断片化）後に使用した薬剤を除去又は失活させる場合、当該方法は当業者に周知の方法で行うことができ、例えば、加熱、透析、限外濾過、イオン交換体処理、pH調整などが例示される。

かくして熱変性されたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲン（以下、便宜上、これらを合わせて、変性II型コラーゲンという）は、そのまま本発明の治療剤又は機能性食品に利用することができ、また慣用のペプチド精製法（例えば、塩析、透析、ゲル濾過、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィ等）を用いて精製した後に使用してもよい。また、凍結乾燥などの手段により粉末化して使用してもよい。

上記の変性II型コラーゲンは、免疫原性が低減されていると共に、未変性のII型コラーゲンに比べて免疫寛容原性が向上しているという特長を有する。更に、生体成分であるII型コラーゲンの変性物であることから、安全性が高いと推定される。これらの点については、後記の実験例に示されるように、変性II型コラーゲンを経鼻投与したマウスを未変性II型コラーゲンで免疫しても、C I Aの発症率、発症指數及び発症足の割合の上昇が著しく抑制・遅延された。

また、200  $\mu$ gのような高投与量で熱変性II型コラーゲンを経鼻投与した場合、抗原特異的抗体（IgG1、IgG2a及びIgG2b）の産生は抑制されていると共に、炎症性のサイトカインであるIFN- $\gamma$ の産生も抑制されていた。このような現象は、アナジー（anergy）又はクローン麻痺として知られている。

また、熱変性II型コラーゲンの0.2（又は2もしくは20） $\mu$ gという少量を吸入させた場合、IgG1の産生は維持されているが、炎症反応と関係があるとされているIgG2a及びIgG2bの産生が抑制されていた。更に、抗炎症性のサイトカインであるIL-10の産生が増強されていた。このような状態は、アクティブ・又はバイスタンダー・サプレッションとして知られている。

更に、本発明者等は、本発明の変性II型コラーゲンは、加熱処理や薬剤処理により低分子量化すると共にII型コラーゲン分子の螺旋型立体構造が崩壊した構造を有すると考えている。Bリンパ球によって造られる抗体は、II型コラーゲンの螺旋状の立体構造を認識して結合するので、本発明者等は、螺旋構造を破壊した変性II型コラーゲンは、未変性II型コラーゲンに比べて副作用などが少なく、安全であると考えている。

なお、II型コラーゲンの変性方法は上記の例に限定されるものではなく、適宜変更して実施することができる。例えば、製造工程上で加熱殺菌を必要とする製品（例えば、食肉加工食品、水産加工食品等の食品、牛乳等の乳製品、果汁、茶等の飲料、液状医薬品、経腸輸液等の医薬品など）において、原料に未変性II型コラーゲンを添加し、加熱処理により熱変性II型コラーゲンを生成させることにより、製品中に熱変性II型コラーゲンを含

有させてもよい。また、II型コラーゲンを含有する原材料（例えば、家畜などの関節軟骨等）から、熱水抽出法により熱変性II型コラーゲン含有物（例えば、スープ等）を調製することもできる。

本発明のRA治療剤は、上記の変性II型コラーゲンを有効成分とするものであり、RAの治療・予防を目的として経口投与（経鼻投与、経腸投与及び経粘膜投与をも含む）される。

投与に際しては、有効成分を経口投与に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与され、このような製剤としては、例えば、経口剤（例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固体剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤など）、吸入剤、坐薬、経腸輸液等が挙げられ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、滑剤、潤滑剤、乳化剤、結合剤等の慣用の添加剤を適宜添加することができる。

本発明のRA治療剤において、有効成分の投与量は、患者の年齢、体重、症状、疾患の程度、投与スケジュール、製剤形態等により、適宜選択・決定されるが、例えば、1日当たり $0.05\text{ }\mu\text{g} \sim 5\text{ g} / \text{kg}$  体重程度とされ、1日数回に分けて投与してもよい。

また、本発明の機能性食品は、前記の変性II型コラーゲンを含有することからなり、そのまま、又は種々の栄養分を加えて、若しくは飲食品中に含有せしめて、RAの治療及び予防に有用な機能性食品（又は食品素材）として食される。例えば、上述した適当な助剤を添加した後、慣用の手段を用いて、食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形して食用に供してもよく、また種々の食品（例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、パン、バター、粉乳など）に添加して使用されたり、水、果汁、牛乳、清

涼飲料等の飲物に添加して使用してもよい。

かかる機能性食品の形態における変性II型コラーゲンの摂取量は、年齢、体重、症状、疾患の程度、食品の形態等により、適宜選択・決定され、例えば、1日当たり $0.05 \mu\text{g} \sim 5\text{g} / \text{kg}$  体重程度とされるが、変性II型コラーゲンは多量に摂取しても生体に悪影響を与えない利点を有することから、それ以上の量を摂取してもよい。

### 産業上の利用可能性

前述のように、RAの発病メカニズムはII型コラーゲンを抗原とする自己免疫疾患であると考えられてい。本発明で用いられる変性II型コラーゲンは、高い経口免疫寛容原性を有するので、本発明の治療剤を投与又は本発明の機能性食品を摂取することにより、免疫応答が抑制され、RAの治療及び予防を行うことができる。従って、本発明によれば、RAの予防を図ることができると共に既に発病しているRAの治療に利用することができる。更に、経口投与（経鼻投与、経腸投与及び経粘膜投与をも含む）や経口摂取によりRAの治療・予防を図ることができ、簡便性且つ安全性に優れる。

### 実施例

以下、実施例及び実験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

#### 実験例 1

##### 熱変性コラーゲンの調製

ウシ由来II型コラーゲンのケン酸溶液（pH 3.0）を、65°Cで15分間の加熱又はオートクレーブ中で加熱（121°C、15分間）して変性させ、変性コラーゲンを得た。

以下、便宜上、65°Cで15分間変性させたII型コラーゲンを「変性コラーゲンA」と、オートクレーブ（121°C、15分間）で変性させたII型コラーゲンを「変性コラーゲンB」と称する。

## 実験例 2

アミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で処理することによる変性（断片化）II型コラーゲンの調製

ウシ由来II型コラーゲンを0.1M炭酸アンモニウム溶液に分散させ  
5 (濃度; 1 mg/ml)、50°Cで30分間加熱した。これにトリプシン  
(TPCK-Trypsin、Sigma社製)を加え(II型コラーゲンに対して2%)、37  
°C 1時間作用させた。そして、12N HClを添加してpH 3.0に調整し、4°Cにて1晩放置して酵素反応を停止させた。その後に、限外濾過  
10 (Centriprep3、アミコン社製)を行い、II型コラーゲンの未切断物及び  
トリプシンを取り除いて、酵素で変性(断片化)したII型コラーゲンを調  
製した。以下、便宜上、上記に準じてトリプシンで変性したII型コラーゲ  
ンを「変性コラーゲンC」と称する。

## 実験例 3

15 CIA (コラーゲン誘導性関節炎) 発症抑制試験 (1)

## ①方法

DBA/1系マウスに免疫7日前にウシ由来変性コラーゲンA、B及び  
Cの10mMクエン酸溶液(コラーゲン含量: 200 μg)を鼻腔より麻  
醉下にて吸入させた。0日目に未変性II型コラーゲンとフロインド完全ア  
ジュバントで免疫し、更に21日目に未変性II型コラーゲンとフロインド  
20 不完全アジュバントで追加免疫して、CIAを発症させた。なお、比較例  
及び対照として、上記の変性コラーゲンに代えて、未変性II型コラーゲン  
200 μg(比較例)、10mMクエン酸(対照)を吸入させた。

## ②結果

25 各群のCIA発症日数を比較し、Mann-Whitney u検定を行った。その結  
果を表1に示す。表1に示されるように、未変性II型コラーゲンでは免疫  
寛容現象は認められないが、変性コラーゲンA、B及びCにおいてはCIA  
の発症が遅延し、明確な免疫寛容が認められた。また、オートクレーブ  
30 を用いて過酷な条件下に変性を施された変性コラーゲンBの方が、また5  
0°Cで30分間加温し、α1(II)型ポリペプチド鎖の3本が摺り合わさっ

てなるII型コラーゲンの螺旋状の立体構造を解きほぐした後に、アミノ酸配列のうちアルギニン及びリジンのC末端を特異的に認識し、切斷するトリプシンを作用させて得られた変性コラーゲンCの方が、変性コラーゲンAよりも免疫寛容原性は強いことが判明した。

5

表1

試験物質	CIA発症日数(平均±SD)
変性コラーゲンA	41.9±5.11 <sup>a</sup>
変性コラーゲンB	48.3±11.1 <sup>b</sup>
変性コラーゲンC	48.3±9.1 <sup>b</sup>
クエン酸	34.1±6.70
未変性II型コラーゲン	33.2±5.80

a : p < 0.02, b : p < 0.005

10

## 実験例4

CIA発症抑制試験(2)

## ①方法

DBA/1系マウスに免疫31日前から1日前までトリ由来変性コラーゲンA及びBの凍結乾燥粉末を餌と混合(4%)して給餌した。CIAの発症は実験例2と同様な方法で行った。なお、比較例及び対照として、上記コラーゲンに代えて、未変性II型コラーゲン(比較例)及びカゼイン(対照)を同量餌に混合して給餌した。

## ②結果

各群のCIA発症率(%)を観察日ごとに比較し、Mann-Whitney u検定

15

20

25

30

を行った。その結果を図1に示す。なお、CIA発症率(%)は、各マウスの四肢において、少なくとも関節炎評価1以上の肢を一つでも認めるとき、これを関節炎マウスとみなし、この関節炎マウス匹数を各群マウス匹数で割ったものをCIA発症率(%)とした。

5 図1に示されるように、未変性II型コラーゲン、変性コラーゲンA及びBにおいて有意( $p < 0.01$ )にCIAの発症が抑制され、明確な免疫寛容が認められた。また、未変性II型コラーゲンよりも変性コラーゲンAの方が免疫寛容原性は強く、更にオートクレーブを用いて過酷な条件下に変性を施された変性コラーゲンBの方が変性コラーゲンAよりも免疫寛容原性が強いことが判明した。

10

### 実験例5

#### 変性II型コラーゲン経鼻投与によるCIA発症抑制試験(投与量の影響)

##### ①方法

15 DBA/1系マウスに免疫7日前にウシ由来変性コラーゲンBの0.2、2、20及び200 $\mu$ g(何れも10mMクエン酸溶液)を鼻腔より麻酔下にて吸入投与した。0日目に未変性II型コラーゲン(200 $\mu$ g)とフロイント完全アジュバント(DIFCO製)で免疫し、更に21日目に未変性II型コラーゲン(200 $\mu$ g)とフロイント不完全アジュバント(DIFCO製)で追加免疫して、その日以降のCIA発症の様子を観察した。なお、対照として、上記の変性コラーゲンBに代えて、10mMクエン酸のみを吸入させた。

20

##### ②結果

25 試験結果を図2及び図3に示す。図2は発症指數の変化を示し、ここで発症指數とは、関節炎の症状(足の腫れ)を常法に従って各足ごとに0~3までの評点で評価し、各マウスについて4足の評点を合計して合計点を求め、各マウスの合計点の平均値をとったものである。また、図3は発症足の割合(%)であり、関節炎を発症した足を合計し、全体の足の数で除して得た割合である。

30

図2及び図3に示されるように、対照(即ち、変性コラーゲンBを事前

に経鼻投与せずに、0日目及び21日目に未変性II型コラーゲンで免疫した試験群)では、追加免疫直後から経時的にCIAの発症指數及び発症足の割合が上昇した。

それに対して、変性コラーゲンBを200μg吸入させた場合には、対照に比べて明らかに、CIAの発症指數及び発症足の割合の上昇は著しく抑制、遅延された。この抑制傾向は、20及び2μgの変性コラーゲンBを吸入させた場合にも、用量依存的に認められた。

また、0.2μgの変性コラーゲンBを吸入させた場合には、200μgを吸入させた場合と同程度に、CIAの発症指數及び発症足の割合の上昇が著しく抑制、遅延された。

#### 実験例6

##### 変性II型コラーゲン経鼻投与が血清中の抗II型コラーゲン抗体価（サブクラス）に及ぼす影響

本試験では、変性II型コラーゲン経鼻投与が抗体（サブクラス）プロファイルに及ぼす影響を調べた。即ち、IgGのサブクラスIgG2aとIgG2bはそれぞれ炎症反応に不可欠な補体との結合能があるので、関節炎の症状と関係があるとされている。

また、IgG2aの産生は、関節炎発症中の関節滑膜中に多く存在するT細胞（Th1タイプ）の産生するIFN-γとも密接な関係がある。すなわち、特定の抗原に対する血清中のIgG2a産生量の低下は、当該抗原に対するTh1タイプの反応が全身性に低下していることを示唆するものと考えられている。

###### ①方法

###### 供試血清の採取

上記実施例5の実験に平行して、免疫後28日目（即ち、追加免疫後7日目）に試験マウス及び対照マウスから採血し、血清を採取した後、下記の方法で抗II型コラーゲン抗体価（サブクラス）を測定した。

### ELISAによるIgGサブクラスの測定

プレート (Maxisorp、NUNC製) に未変性II型コラーゲン (5  $\mu$ g／ウェル) を吸着させ、PBS-Tweenで洗浄した後に、適宜希釈したマウスの血清を加えた。PBS-Tweenで洗浄し、その後にアルカリフォスファターゼ標識したウサギ抗マウス抗体 (抗マウスIgG1、抗マウスIgG2a、又は抗マウスIgG2b、何れもZYMED製) を加えた。PBS-Tweenで洗浄し、その後に基質溶液 (パラニトロフェノール2リン酸、東京化成製) を加えた。30分間放置後、5N NaOHを加えて、反応を停止させ、405nmにおける吸光度を測定した。

その結果を図4に示す。

#### ②結果

対照 (即ち、変性コラーゲンBを事前に経鼻投与せずに、0日目及び21日目にII型コラーゲンで免疫した試験群) では、IgG1、IgG2a及びIgG2bが産生されていた。その結果は、図2及び3に示すCIAの発症指數及び発症足の割合の上昇と対応していた。

それに対して、変性コラーゲンB 200  $\mu$ gを吸入させた場合には、対照に比べて明らかに、IgG1、IgG2a及びIgG2bの産生が抑制されていた。その結果は、図2及び3に示すCIAの発症指數及び発症足の割合の上昇の抑制と対応していた。

また、変性コラーゲンB 20、2又は0.2  $\mu$ gを吸入させた場合には、対照に比べて、IgG1の産生は抑制されていなかった。一方、IgG2a及びIgG2bの産生は、対照に比べて抑制されていた。特に、0.2  $\mu$ gを吸入させた場合のIgG2a及びIgG2bの産生の抑制の程度は、200  $\mu$ gを吸入させた場合と同程度であり、図2及び3に示すCIAの発症指數及び発症足の割合の上昇の抑制と対応していた。

これらのことから、変性コラーゲンBの20、2又は0.2  $\mu$ g (特に、0.2  $\mu$ g) の投与は、補体との結合能から、関節炎の症状に関与するとされるIgG2a及びIgG2bの産生を抑制するという効果を奏する。

さらには、変性コラーゲンBの20、2又は0.2  $\mu$ gの投与は、IgG

1の產生能自体は抑制しないので、外来異物を認識し排除する機能を有する抗体產生能自体を抑制することはないという効果を奏する。

### 実験例 7

#### 5 変性II型コラーゲンを経鼻投与したマウスより分離したリンパ球の產生するサイトカイン（変性II型コラーゲン刺激の影響）

本試験では、炎症と関連するとして知られているサイトカイン（IFN- $\gamma$ とIL-10）を測定し、変性II型コラーゲン刺激の影響を調べた。

なお、TGF- $\beta$ やIL-10は抗炎症性（抑制性）のサイトカインとして知られており、実際のRAにおいても重要な免疫学的調節機能を果たすとも報告されている（J. Exp. Med. 179, 15617-15627, 1994）。

##### 10 ①方法

###### リンパ球の分離と培養

前記実験例5の実験と同様に、DBA/1系マウスに免疫7日前にウシ由来変性コラーゲンBの0、0.002、0.02、0.2、2、20及び200 $\mu$ gを鼻腔より麻酔下にて吸入させた。そして、0日目に未変性II型コラーゲン（100 $\mu$ g）とフロイント完全アジュバント（DIFC O製）をマウス足蹠部に免疫した。

そして、10日目に、膝下リンパ節を摘出し単一細胞懸濁液を調製し、20 96穴プレート（FALCON製）に播種した（1×10<sup>5</sup>/ウェル）。各ウェルに無血清培地（X-vivo20、BIOWHITTAKER製）を加え、さらにII型コラーゲン（最終濃度；500 $\mu$ g/ml）を加え、5%CO<sub>2</sub>条件下で3日間培養し、培養上清を得た。

同様に、II型コラーゲンを添加せずに培養し、又はII型コラーゲンを添加せずにコンカナバリンA（最終濃度；5 $\mu$ g/ml）を添加して培養し、それぞれの培養上清を得た。なお、コンカナバリンAはT細胞のマイトケイシンであり、全てのT細胞に抗原非特異的に刺激を与えるため、陽性対照として用いた。

###### サンドイッチELISAによるサイトカインの測定

30 プレート（Maxisorp、NUNC製）に抗マウスサイトカイン・ラット単クロー

ン抗体（抗マウス IL-10 抗体：JES5-2A5、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体：RA-6A2、いずれもPHARMINGEN製）をコーティング（50  $\mu$  l/ウェル）し、PBS-Tweenにて洗浄し、3% BSA加PBS-Tweenにてブロックした。そして、適宜希釈した上記の培養上清を加えた。

PBS-Tweenにて洗浄した後に、ビオチン標識した抗マウスサイトカイン・ラット単クローニング抗体（抗マウス IL-10 抗体：SXC-1、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体：XMG1.2、いずれもPHARMINGEN製）を加えた。

PBS-Tweenで洗浄した後に、アビジン化アルカリフェオヌフターゼ（ZYMED製）を加えた。更にPBS-Tweenで洗浄し、その後に基質溶液（パラニトロフェノール2リン酸、東京化成製）を加えた。

60分間放置後、5N NaOHを加えて、反応を停止させ、405 nmにおける吸光度を測定し、IFN- $\gamma$  又は IL-10 の産生量を測定した。

対照（変性コラーゲンB投与量0）に対する IFN- $\gamma$  又は IL-10 の産生量の傾向を表2に示す。

表2

変性コラーゲンBの経鼻投与量	IFN- $\gamma$	IL-10
200 $\mu$ g	↓↓	↓
20 $\mu$ g	↓	↓
2 $\mu$ g	→	↑
0.2 $\mu$ g	→	↑↑
0.02 $\mu$ g	→	↑↑
0.002 $\mu$ g	→	↑

↑↑：対照に対して明らかに産生が促進される。

↑：対照に対して産生が促進される傾向にある。

→：対照に対して差異が認められない。

↓：対照に対して抑制される傾向にある。

↓↓：対照に対して明らかに産生が抑制されている。

## ②結果

培地にコンカナバリンAを添加した場合（陽性対照）には、マウスより採取したリンパ球の均一な増殖が観察された。一方、II型コラーゲンを培地に添加した場合には、コラーゲンに反応するリンパ球がコロニーを形成して増殖した。このコラーゲン反応性のリンパ球におけるサイトカイン産生を測定したところ、次のような結果が得られた。

I FN- $\gamma$ については、変性コラーゲンBの200  $\mu$ gを吸入させたマウスより採取したリンパ球をII型コラーゲンとともに培養した場合には、変性コラーゲンBを吸入させなかったマウス（対照）より採取したリンパ球を同様に培養した場合に比べて、炎症を増悪させるI FN- $\gamma$ の産生が抑制されていた。

I L-10については、変性コラーゲンBの0.002、0.02、0.2又は2  $\mu$ gを吸入させたマウスより採取したリンパ球をII型コラーゲンとともに培養した場合には、変性コラーゲンBを吸入させなかったマウス（対照）より採取したリンパ球を同様に培養した場合に比べ、抗炎症作用を有するI L-10の産生が促進されていた。特に、変性コラーゲンBの0.2又は0.02  $\mu$ gを吸入させたマウスより採取したリンパ球をII型コラーゲンとともに培養した場合には、I L-10の産生が促進されていた。

## 実験例8

### 熱変性物の検討

熱変性物の性状を検討するために、10 mMクエン酸水溶液（pH 3.0）に、トリ由来II型コラーゲンを0.1、0.3及び1.0%となるよう溶解し、65°C 20分間、100°C 20分間及びオートクレーブ（120°C 20分間）の加熱変性を行い、得られた変性液を電気泳動に付した。その結果を図5に示す。図5において、Aはオートクレーブ（120°C 20分間）処理コラーゲン、Bは100°C 20分間処理コラーゲン、Cは6

5 °C 20 分間処理コラーゲン、Dは未変性のコラーゲンを示し、各サンプルの3つのレーンは左側から0. 1、0. 3及び1. 0%のコラーゲン濃度である。また、左右両端のレーンは分子量マーカーである。

図5に示されるように、未変性II型コラーゲンは $\alpha$ 1鎖 (MW: 100,000)のみから構成されているが、加熱変性により低分子量成分が増加し、100°C 20分間及びオートクレーブ (120°C 20分間) の加熱変性を行った場合には、 $\alpha$ 1鎖は消失していた。このことから、限定分解された低分子成分が免疫寛容原として作用していることが示唆された。

ウシ由来II型コラーゲンについて、同様な実験を行ったところ、図5と同様な電気泳動パターンが得られた。

また、ウシ由来変性コラーゲンCについて、同様な電気泳動実験を行ったところ、 $\alpha$ 1鎖が消失するとともに、オートクレーブ (120°C、20分間) 処理物よりも更に低分子化され、分子量10,000以下の成分として検出された。このことから、限定分解された低分子成分が免疫寛容原として作用していることが示唆された。

#### 実験例9

実験例1におけるクエン酸溶液に代えて水酸化ナトリウム溶液 (pH 11. 0) を用いる以外は実験例1と同様にして熱変性を行い、熱変性II型コラーゲンを調製した。

#### 実施例1

ウシ由来変性コラーゲンA	0. 5 m g
ステアリン酸マグネシウム	5 m g
コーンスターク	20 m g
乳糖	174. 5 m g

常法に準じ、上記の組成からなる混合物を、打錠成型し、錠剤を得た。

#### 実施例2

ニワトリ由来変性コラーゲンB	0. 5 m g
----------------	----------

ステアリン酸マグネシウム 5 m g

乳糖 194.5 m g

常法に準じ、上記の組成からなる混合物を、ゼラチン硬カプセルに充填し、カプセル剤を得た。

5

#### 実施例 3

ウシ由来変性コラーゲンC 0.5 m g

ステアリン酸マグネシウム 5 m g

乳糖 194.5 m g

10 常法に準じ、上記の組成からなる混合物を、ゼラチン硬カプセルに充填し、カプセル剤を得た。

#### 実施例 4

15 天然果汁（濃縮果汁還元）に、ウシ由来変性コラーゲンBを天然果汁200 m l当り0.5 m gの割合で混合した後、常法に準じて殺菌し、アセプティック包装して、果汁製品を得た。

#### 実施例 5

20 ウインナソーセージ用練り肉に、ウシ由来変性コラーゲンBを当該練り肉15 g当り30  $\mu$  gの割合で混合した後、常法に準じてソーセージケーシングに充填し、燻煙し、殺菌し、冷却後に包装し、ワインナソーセージを得た。

#### 実施例 6

25 ウシ由来変性コラーゲンBに代えて、ウシ由来変性コラーゲンCを用いる以外は実施例4と同様にしてワインナソーセージを得た。

#### 実施例 7

30 ニワトリ胸骨軟骨（通称、ヤゲン軟骨）150 gに水1000 m lを加え、タマネギ、ニンジン、パセリ、セロリ、ショウガなどの香味野菜、及

び粒コショウを加えて、煮立て、弱火にて3時間加熱した。冷却後、ストレーナーで濾過し、塩、コショウで調味し、トリスープを得た。

なお、同スープについて、電気泳動実験を行ったところ、図5のBと同様の泳動像が観察された。また、抗トリII型コラーゲン・ウサギ抗体を用いて、ウエスタン ブロッティング実験を行ったところ、染色像が観察された。これらのことから、当該トリスープ中には、変性II型コラーゲンが含有されていることが判明した。

10

15

20

25

30

## 請求の範囲

1. 酸性もしくはアルカリ性条件下に熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンを有効成分として含有する経口慢性関節リウマチ治療剤。  
5
2. 热変性させたII型コラーゲンが、II型コラーゲンを60°C以上で且つ10分間以上の熱変性を行って得たものである請求の範囲1記載の経口慢性関節リウマチ治療剤。
3. 热変性条件が、pH 2.0~4.5又は10.0~12.0、100  
10 ~120°C、15分間~10時間である請求の範囲2記載の経口慢性関節リウマチ治療剤。
4. アミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンが、II型コラーゲンを30°C以上で且つ10分間以上加温して、 $\alpha$ 1 (II)型ポリペプチド鎖の3本が擦り合わさってなるII型コラーゲンの螺旋状の立体構造を解き、その後に、アミノ酸配列を特異的に認識し、切断する薬剤を作用させて得たものである請求の範囲1記載の経口慢性関節リウマチ治療剤。  
15
5. II型コラーゲンが、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ヒト、サル、ウサギ、マウス、ラット等の哺乳類、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチヨウ等の鳥類、カメ、ヘビ等の爬虫類、マグロ、カツオ、サケ、サメ、エイ等の魚類由来である請求の範囲1記載の経口慢性関節リウマチ治療剤。  
20
6. 製剤形態が、経口投与製剤、経鼻投与製剤、経腸投与製剤又は経粘膜投与製剤である請求の範囲1記載の経口慢性関節リウマチ治療剤。
7. 酸性もしくはアルカリ性条件下に熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンの有効量をヒトに経口投与することからなる慢性関節リウマチの治療方法。  
25
8. 経口慢性関節リウマチ治療剤を製造するための、酸性もしくはアルカリ性条件下に熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンの使用。  
30

9. 酸性もしくはアルカリ性条件下に熱変性させたII型コラーゲン又はアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンを含有する機能性食品。

10. 热変性させたII型コラーゲンが、II型コラーゲンを60°C以上で且つ10分間以上の熱変性を行って得たものであり；またアミノ酸配列を特異的に認識する薬剤で変性させたII型コラーゲンが、II型コラーゲンを30°C以上で且つ10分間以上加温して、 $\alpha 1$  (II) 型ポリペプチド鎖の3本が撲り合わさってなるII型コラーゲンの螺旋状の立体構造を解き、その後に、アミノ酸配列を特異的に認識し、切断する薬剤を作用させて得たものである請求の範囲9記載の機能性食品。

15

20

25

30

図 1

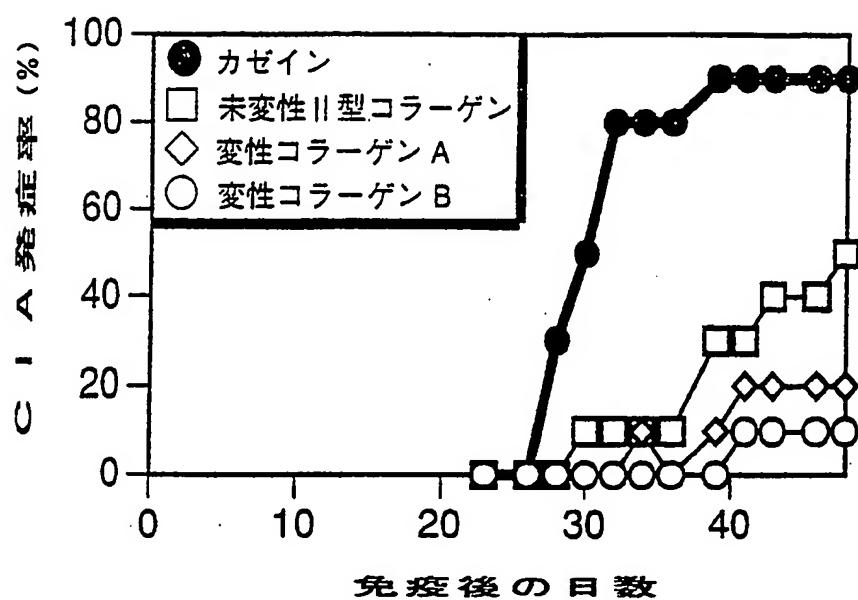


図 2

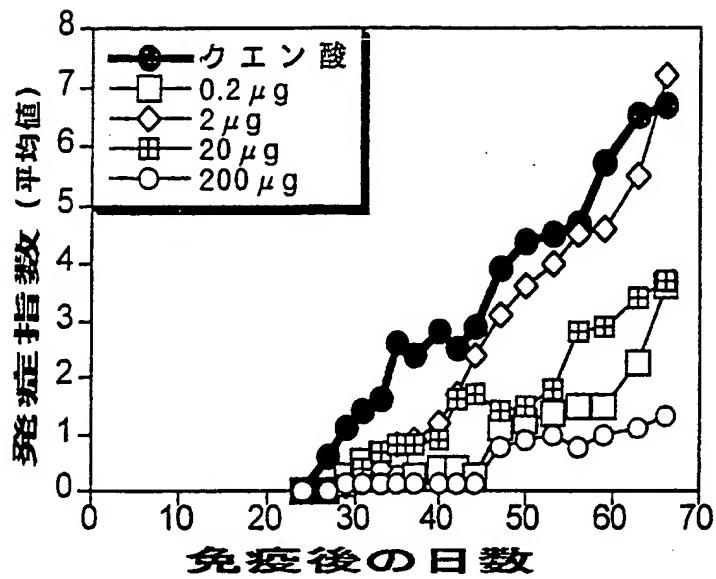


図 3

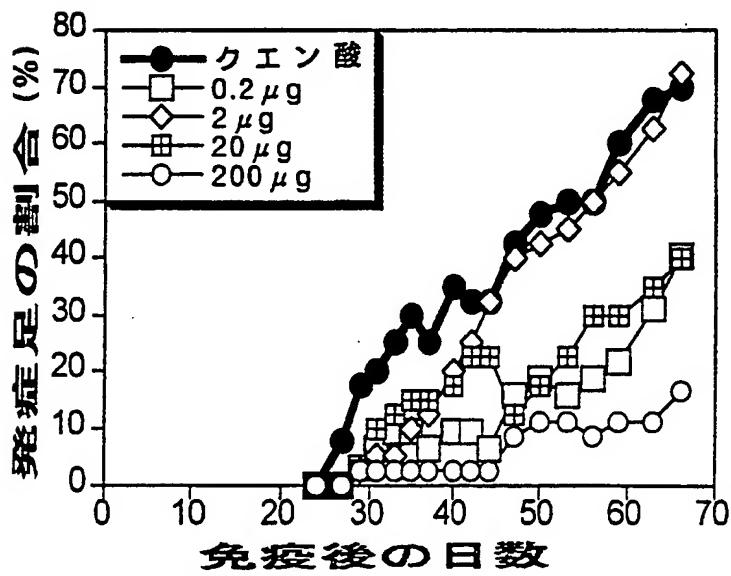


图 4

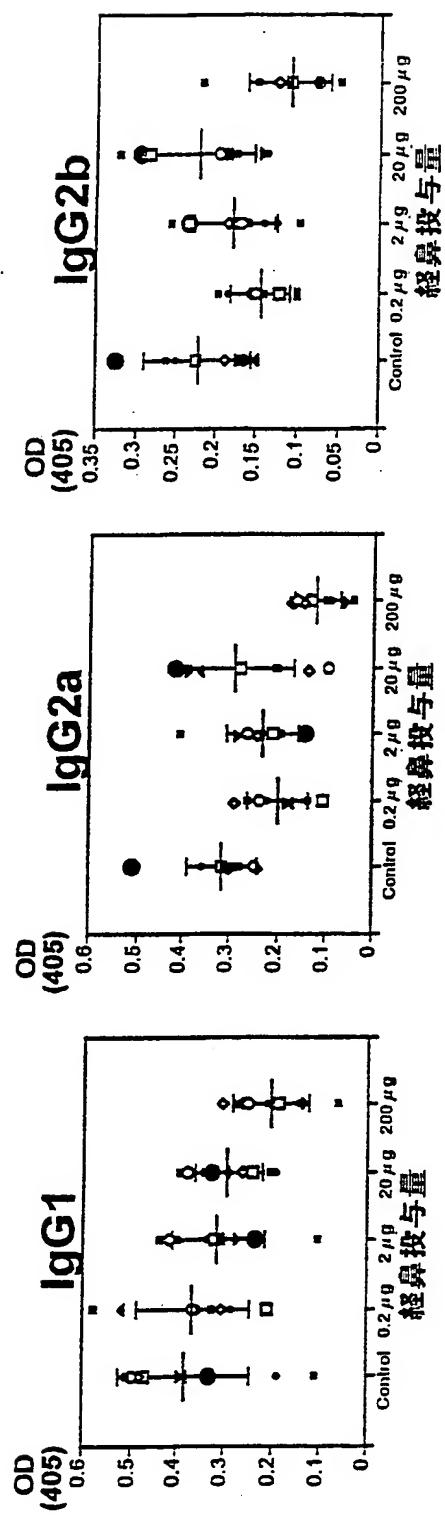
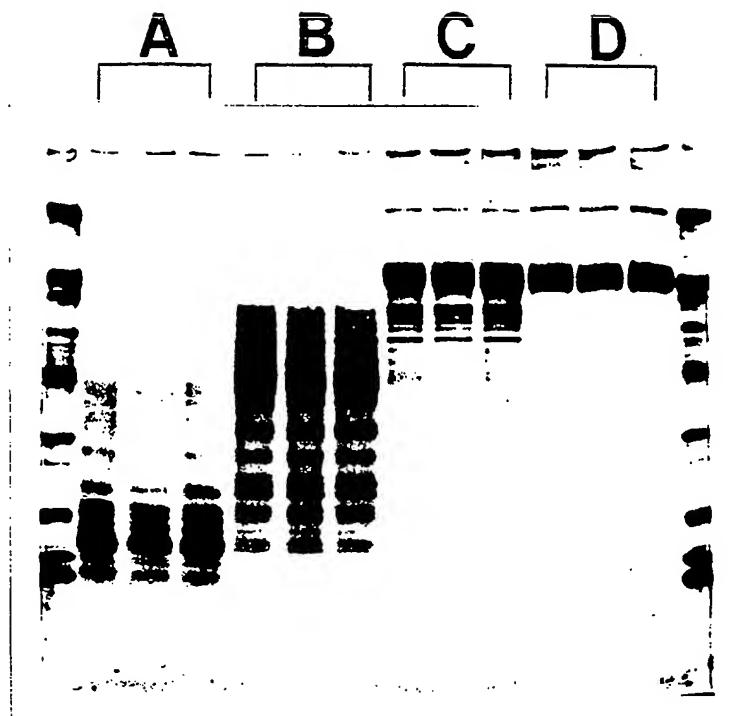


図 5



A : オートクレーブ (120°C, 20分間) 处理

B : 100°C, 20分間処理

C : 65°C, 20分間処理

D : 未変性

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01623

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/39, A23L1/305

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/39, A23L1/305

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE (COLLAGEN, RHEUMATOID, DENATURE)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	European Journal of Immunology Vol. 23, No. 7 (1993) P. 1588-94, particularly Abstract, Discussion (Chemical Abstracts 119:157794)	1-6, 8-10
Y	JP, 7-138187, A (Nippon Hamu K.K.), May 30, 1995 (30. 05. 95), Particularly Abstract, page 3, column 4, lines 19 to 26 (Family: none)	1-6, 8-10
A	US, 5399347, A (Autoimmune, Inc.), March 21, 1995 (21. 03. 95) & WO, 94/7520, A & EP, 662838, A	1-6, 8-10
PA	US, 5529786, A (Eugene R. Moore), June 25, 1996 (25. 06. 96) (Family: none)	1-6, 8-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
October 29, 1996 (29. 10. 96)

Date of mailing of the international search report

November 12, 1996 (12. 11. 96)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01623

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 7 pertains to methods for prevention or treatment of  
the human or animal body.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such  
an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all  
searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment  
of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report  
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is  
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K38/39, A23L1/305

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K38/39, A23L1/305

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE (COLLAGEN, RHEUMATOID, DENATURE)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	European Journal of Immunology Vol. 23, No. 7 (1993) P. 1588-94 特にAbstract, Discussion (Chemical Abstracts 119: 157794)	1-6, 8-10
Y	JP, 7-138187, A (Nippon Hamu KK.) 30. 5月. 1995 (30. 05. 95) 特にアブストラクト及び第3頁第4欄第19行目～ 26行目, ファミリーなし	1-6, 8-10
A	US, 5399347, A (Autoimmune, Inc.) 21. 3月. 1995 (21. 03. 95) & WO, 94/7520, A & EP, 662838, A	1-6, 8-10

 C欄の続きにも文献が例挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

29. 10. 96

## 国際調査報告の発送日

12. 11. 96

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田村 聖子

4C 9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲7は、人間又は動物の予防又は治療方法にかかるものである。

2.  請求の範囲                    は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲                    は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
PA	US, 5529786, A (Eugene R. Moore) 25. 6月. 1996 (25. 06. 96), ファミリーなし	1-6, 8-10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- \*  **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**